

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 08-029428

(43)Date of publication of application : 02.02.1996

(51)Int.Cl.

G01N 33/577

G01N 33/53

G01N 33/544

G01N 33/545

G01N 33/547

(21)Application number : 06-191727

(71)Applicant : FUNAYAMA MASASHI

(22)Date of filing : 11.07.1994

(72)Inventor : FUNAYAMA MASASHI

(54) COVALENT BONDING METHOD OF MONOCLONAL ANTIBODY AGAINST WHITE CORPUSCLE-DIFFERENTIATED ANTIGEN TO CARRIER BY PHOTOCHEMICAL REACTION, FRACTIONAL QUANTITATIVE DETERMINING METHOD OF CELL USING THIS CARRIER, AND GUIDING METHOD OF LYMPHOKINE ACTIVATED KILLER CELL

(57)Abstract:

PURPOSE: To immobilize a monoclonal antibody to an inactive carrier by covalent- bonding the monoclonal antibody against a white corpuscle-differentiated antigen to an inactive carrier by means of photochemical reaction.

CONSTITUTION: A polymer having an azido group or a low molecular weight compound is applied to the surface of insoluble carrier. As this polymer, styrene or the like wherein the azide group is introduced is listed, however, in view of stability, a copolymer of styrene, methyl metacrylate and dimethyl acrylamide is particularly desirable. As the low molecular weight compound, an ionic group or the like is listed, however, in order to stably immobilize a monoclonal antibody against a white corpuscle differentiated antigen, containing of two or more azide groups are desirable. After applying the polymer or low molecular weight compound, further a monoclonal antibody solution against the white corpuscle differentiated antigen is applied to be adsorbed to the insoluble carrier, and by ultraviolet irradiation through a mercury lamp or the like, covalent bonding for immobilization can be conducted in a short time.

LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

Copyright (C): 1998,2003 Japan Patent Office

BEST AVAILABLE COPY

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平8-29428

(43) 公開日 平成8年(1996)2月2日

(51) Int.Cl. ⁶	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
G 0 1 N	33/577	B		
	33/53	K		
	33/544	Z		
	33/545	Z		
	33/547			

審査請求 未請求 請求項の数17 書面 (全 8 頁)

(21) 出願番号 特願平6-191727

(22) 出願日 平成6年(1994)7月11日

(71) 出願人 591053328

船山 政志

埼玉県大宮市指扇領別所214-1

(72) 発明者 船山 政志

埼玉県大宮市指扇領別所214-1

(54) 【発明の名称】 光化学反応による、白血球分化抗原に対するモノクローナル抗体の担体への共有結合方法と、その担体を用いた細胞の分画定量方法、および Lymphokine Activated Ki

(57) 【要約】

【目的】 光化学反応による、白血球分化抗原に対するモノクローナル抗体の担体への共有結合方法と、その担体を用いた細胞の分画方法および定量方法および、Lymphokine Activated Killer cell の誘導方法を提供する。

【構成】 光化学反応により、白血球分化抗原に対するモノクローナル抗体を共有結合させた担体および実験器具および測定試薬よりなる。

BEST AVAILABLE COPY

【特許請求の範囲】

【請求項1】 不溶性担体の表面にアジド基を有する化合物を塗布した後、白血球分化抗原に対するモノクローナル抗体溶液を塗布し、更に光を照射することこととなる、白血球分化抗原に対するモノクローナル抗体の共有結合方法。

【請求項2】 不溶性担体の表面に α -ニトロベンジルエステル基を持つ共重合体の薄膜を形成した後、光照射によりカルボキシル基を生成させ、更に水溶性縮合剤を用いて白血球分化抗原に対するモノクローナル抗体を化学結合させる方法とことなる、白血球分化抗原に対するモノクローナル抗体の共有結合方法。

【請求項3】 緩衝液中で p -azidobenzoyloxy succinimideと反応させることにより、フェニルアジド基を導入した白血球分化抗原に対するモノクローナル抗体を被固定化担体に塗布した後、更に光を照射することこととなる、白血球分化抗原に対するモノクローナル抗体の共有結合方法。

【請求項4】 請求項1、または請求項2、または請求項3記載の方法により、白血球分化抗原に対するモノクローナル抗体を共有結合したことを特徴とする、不溶性担体および実験器具。

【請求項5】 請求項1、または請求項2、または請求項3記載の方法により調製した不溶性担体を用いて、細胞を分画する方法。

【請求項6】 請求項1、または請求項2、または請求項3記載の方法により調製した不溶性担体を用いて、細胞を分画除去する方法。

【請求項7】 請求項1、または請求項2、または請求項3記載の方法により調製した不溶性担体を用いて、分画した細胞を定量する方法。

【請求項8】 請求項1、または請求項2、または請求項3記載の方法により抗CD3抗体(OKT3)を共有結合した不溶性担体と、interleukin-2と末梢血リンパ球とをin vitroにより培養し、Lymphokine Activated Killer cellを誘導する方法。

【請求項9】 請求項1、または請求項2、または請求項3記載の方法により抗CD4抗体を共有結合した不溶性担体または、CD8抗体を共有結合した不溶性担体を用いて、末梢血リンパ球からCD4⁺細胞を分画した後、分画したCD4⁺細胞をinterleukin-2と共に、in vitroにより培養し、Lymphokine Activated Killer cellを誘導する方法。

【請求項10】 請求項1、または請求項2、または請求項3記載の方法により抗CD34抗体を共有結合した不溶性担体、および抗CD38抗体を共有結合した不溶性担体および、抗HLA-A抗体を共有結合した不溶性担体および、抗HLA-B抗体を共有結合した不溶性担体

および、抗HLA-C抗体を共有結合した不溶性担体および、抗HLA-DR抗体を共有結合した不溶性担体および、抗HLA-DP抗体を共有結合した不溶性担体および、抗HLA-DQ抗体を共有結合した不溶性担体および、single cell depositing unitとを用いて造血幹細胞を分画する方法。

【請求項11】 請求項1、または請求項2、または請求項3記載の方法により抗CD34抗体を共有結合した不溶性担体、および抗CD38抗体を共有結合した不溶性担体および、血しょう分離器、および請求項14記載の繊維製品を用いて造血幹細胞を分画する方法。

【請求項12】 請求項10および請求項11記載の方法により分画した造血幹細胞をサイトカインと共にin vitro法により増殖する方法。

【請求項13】 不溶性担体が、ポリビニルアルコール、およびセルロース、およびポリアクリルアミド、およびポリアクリル酸、およびメタクリル酸、およびポリメチルメタクリレート、およびポリイソプロピルアクリルアミド、およびポリエステル、およびポリアミド、およびポリエチレン、およびポリプロピレン、およびポリスチレンの中から選択されたことを特徴とする請求項4記載の不溶性担体および実験器具。

【請求項14】 10~90%のバルブを含有し、その繊維径が3~50 μ mで、繊維密度が0.3~1.5g/cm³であることを特徴とする繊維製品。

【請求項15】 10~90%のバルブを含有し、その繊維径が3~50 μ mで、繊維密度が0.3~1.5g/cm³であることを特徴とする繊維製品を充填したカラム。

【請求項16】 10~90%のバルブを含有し、その繊維径が3~50 μ mで、繊維密度が0.3~1.58g/cm³であることを特徴とする繊維製品を用いた造血幹細胞の分画方法。

【請求項17】 請求項1、または請求項2、または請求項3記載の方法により調製した不溶性担体および請求項14記載の繊維製品を用いて、細胞を分画する方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】 本発明は、第一に、光化学反応により白血球分化抗原に対するモノクローナル抗体を共有結合させた不溶性担体と、それを用いた細胞および末梢血リンパ球の分画方法および定量方法に関する。本発明は第二に、光化学反応により白血球分化抗原に対するモノクローナル抗体を共有結合させた不溶性担体を用いた、Lymphokine Activated Killer cellの誘導方法に関する。本発明は第三に、バルブを含有する繊維製品を用いた造血幹細胞の分画方法に関する。

【従来の技術】

【0002】 1) 骨髓液中に混在する白血球の除去

骨髄移植による副作用は、移植中或いは移植後短時間内に生じる即時型と遅発型に大別される。これらの副作用は、骨髄液中に混在する白血球が原因となる免疫学的機序により発現する。即時型には、非溶血性発熱反応があり、遅発型には、骨髄移植後の移植片対宿主病 (graft versus host disease; GVHD)、免疫変調作用等がある。宿主にとって外来の異物に対する反応は、抗原提示細胞を介してTリンパ球によって認識される。抗原提示細胞に共通する性質は、細胞表面に主要組織適合性複合体 (MHC) のクラスIおよびクラスII分子をもっている。ヒトでは、それぞれ、HLA-A、HLA-B、HLA-C、HLA-D、HLA-DP、HLA-DQとして表現される。MHCクラスI分子は、すべての有核細胞および血小板上に発現しており、クラスII分子は骨髄由来の一定の細胞、特にマクロファージ、Bリンパ球、皮膚のランゲルハンス細胞、樹状細胞にのみ発現している。骨髄移植による同種免疫は、通常、レシピエントの抗原提示細胞がレシピエントのTリンパ球に対して、ドナーのHLA抗原を提示するのではなく、骨髄液中に含まれるドナーの抗原提示細胞が抗原を提示し、レシピエントのTリンパ球によって非自己と認識される。すなわち、レシピエントTリンパ球受容体は、抗原提示細胞のクラスIIペプチド複合体と結合し、更に、アクセサリリガンドであるLFA-I/ICAM-1、CD2/LFA-3の結合によって反応が補助される。この結果、Tリンパ球 (CD4細胞) は活性化され、IL-1 IL-4 IL-5等、種々のサイトカインを産生し、Bリンパ球の反応が起こり、抗体産生が生じ、同種免疫が成立する。この成立の条件を考えれば、白血球および血小板を除いた骨髄を移植することは、クラスII分子をもつドナー抗原提示細胞が存在しない為、同種免疫は生じない。

2) 幹細胞の分離

急性白血病や悪性リンパ腫に対する自家骨髄移植に於いては、採取した自家骨髄細胞中に混入した腫瘍細胞が、自家骨髄移植後の再発の原因になることが予想される為、抗癌剤の使用が行なわれる場合や、モノクローナル抗体によるin vitro purgingが行なわれる場合がある。一方、造血幹細胞に発現しているCD34抗原に対するモノクローナル抗体を用いて、造血幹細胞をpositive selectionする方法も試みられている。造血幹細胞を濃縮する方法には、骨髄細胞からCD34抗原に対するモノクローナル抗体により、特異的にCD34⁺細胞を吸着させ、他の細胞を除去した後、CD34⁺細胞をpositive selectionする方法がある。この方法を応用した市販の装置には、磁気ビーズ法によるDyna-beads (Dyna1社)、CD34抗原に対するモノクローナル抗体を非特異吸着させたフラスコを用いて選別する、パンニング法であるMicroCELLector (A

IS社)、CD34抗原に対するモノクローナル抗体を固定化したゲルを充填したカラムを用いたCEPRATE LC (CellPro社) の3種類がある。これら市販の装置を用いれば、CD34⁺細胞をおよそ100倍に濃縮することが可能である。濃縮後のCD34陽性率はおよそ65%、CD34⁺細胞の回収率はおよそ35%、白血球の除去率はおよそ80%である。以上の様に、CD34⁺細胞の回収率が悪いこと、白血球、血小板および癌細胞の除去率が充分でないこと等の理由から、現在は、in vitro purgingやpositive selectionの有用性が臨床試験研究によって、広汎に容認されるには至っていない。

3) モノクローナル抗体の剥離

CD34抗原に対するモノクローナル抗体を非特異吸着させた、上記市販担体のもう一つの欠点は、リガンドであるモノクローナル抗体の剥離である。本発明の発明者は、既に、前記のリガンド剥離の欠点を克服すべく、光反応により、抗生物質を担体に共有結合させる方法を考案し出願に及んだ。今回、本発明の発明者は、光化学反応により白血球分化抗原に対するモノクローナル抗体を共有結合させた担体が、前記のリガンド剥離の欠点を克服することが可能であることを見出した。

4) リンパ球の活性化

免疫担当細胞をInterleukin-2 (IL-2) と共に培養し、Lymphokine Activated Killer (LAK) 細胞を誘導して、これらの細胞を用いる養子免疫療法がある。LAK細胞は、Classical NK細胞に抵抗性を示す腫瘍細胞のみならず、自己の新鮮腫瘍細胞に対しても細胞障害性を示し、広いスペクトラムを持つKiller細胞であることが示されている。しかしながらLAK療法には、高濃度のIL-2による副作用や、長期間の培養による感染の危険を伴うという問題がある。今回、本発明の発明者は、光化学反応により白血球分化抗原に対するモノクローナル抗体を共有結合させた担体を用いて、in vitroで免疫担当細胞をInterleukin-2 (IL-2) と共に培養する方法が、リガンド剥離の欠点および高濃度のサイトカインによる副作用の問題を克服することが可能であることを見出した。

【0003】

【発明が解決しようとする問題点】本発明の発明者は、光反応により白血球分化抗原に対するモノクローナル抗体を共有結合させた担体が、従来品および従来法と比較して、細胞を効率良く吸着することを見出し出願に及んだ。しかも、エンザイムイムノアッセイ (EIA) による測定の結果、当該担体からはリガンドの剥離は認められなかった。すなわち本発明は、

1) 他家骨髄液から殆どの白血球および血小板を除去し、他家骨髄移植時に同種免疫を回避できる担体および方法を提供する。

2) 造血性幹細胞含有自家骨髓液および他家骨髓液から、幹細胞を完全に純化できる担体および方法を提供する。

3) 白血球分化抗原に対するモノクローナル抗体が剥離しない末梢血リンパ球分離用担体および末梢血リンパ球の分離方法を提供する。

4) 白血球分化抗原に対するモノクローナル抗体が剥離しない、リンパ球活性化用担体およびリンパ球活性化の方法を提供する。

5) バルブを含有する繊維製品を用いた造血幹細胞の分離方法を提供する。ことに関する。

【課題を解決するための手段】

【0005】従来の担体へのリガンドの固定化方法には、

1) リガンドが部分的な修飾を受けることにより、リガンドの高次構造や活性中心等が部分的に破壊される恐れがある。

2) リガンドの自由な動きが制限されることにより、被検検体との相互作用が起こりにくくなり、その結果リガンドの活性の低下が起こる。

3) リガンドに優れた活性と安定性を与える固定化条件を見つけることが困難である。

4) リガンドを非特異吸着により固定化した場合には、リガンドが剥離し易い。等の欠点があった。一方、フェニルアジド基は、紫外線照射により高反応性の中間体であるナイトレンを経由し、近傍の炭素等と共有結合することが知られている(吉本薫: フォトポリマーハンドブック: 工業調査会1989)。また、人工臓器に生体適合性を付与する方法として、材料表面の改質方法(特願、平2-206573)が知られている。同方法は、デバイスの表面にアジド基を介して、アルブミン等の蛋白質を共有結合させることにより、生体適合性を付与する方法である。

【0006】本発明の発明者は、このフェニルアジド基の紫外線照射法を、白血球分化抗原に対するモノクローナル抗体の強固な結合に応用することを考案した。即ち、本発明の発明者は、リガンドの固定化について鋭意検討した結果、

a) 不溶性担体の表面にアジド基を有する化合物を塗布した後、被固定化白血球分化抗原に対するモノクローナル抗体を塗布し、更に光を照射することからなる白血球分化抗原に対するモノクローナル抗体の固定化方法。

b) 不溶性担体の表面に α -ニトロベンジルエステル基を持つ共重合体の薄膜を形成した後、光照射によりカルボキシル基を生成させ、更に、水溶性縮合剤を用いて、白血球分化抗原に対するモノクローナル抗体を化学結合させる方法とからなる白血球分化抗原に対するモノクローナル抗体の固定化方法。

c) 緩衝液中で *p*-azidobenzoyloxy succinimide と反応させることにより、フェ

ニルアジド基を導入した白血球分化抗原に対するモノクローナル抗体を被固定化担体に塗布した後、更に光を照射することからなる、白血球分化抗原に対するモノクローナル抗体の固定化方法。によりリガンドである白血球分化抗原に対するモノクローナル抗体を担体に容易に、強固に固定化できることを発見し、本発明を完成した。

【0007】

【発明の効果】本発明は、

(a) 不溶性担体の表面にアジド基を有する化合物を塗布した後、白血球分化抗原に対するモノクローナル抗体溶液を塗布し、更に光を照射することからなる、白血球分化抗原に対するモノクローナル抗体の共有結合方法。

(b) 不溶性担体の表面に α -ニトロベンジルエステル基を持つ共重合体の薄膜を形成した後、光照射によりカルボキシル基を生成させ、更に水溶性縮合剤を用いて白血球分化抗原に対するモノクローナル抗体を化学結合させる方法とからなる、白血球分化抗原に対するモノクローナル抗体の共有結合方法。

c) 緩衝液中で *p*-azidobenzoyloxy succinimide と反応させることにより、フェニルアジド基を導入した白血球分化抗原に対するモノクローナル抗体を被固定化担体に塗布した後、更に光を照射することからなる、白血球分化抗原に対するモノクローナル抗体の共有結合方法。

(d) (a) または (b) または (c) の方法により、白血球分化抗原に対するモノクローナル抗体を共有結合したことを特徴とする、不溶性担体および実験器具。

(e) (a) または (b) または (c) の方法により調製した不溶性担体を用いて、細胞を分画する方法。

(f) (a) または (b) または (c) の方法により調製した不溶性担体を用いて、細胞を分画除去する方法。

(g) (a) または (b) または (c) の方法により調製した不溶性担体を用いて、細胞を定量する方法。

(h) (a) または (b) または (c) の方法により抗CD3抗体(OKT3)を共有結合した不溶性担体と、interleukin-2と末梢血リンパ球とを *in vitro* により培養し、Lymphokine Activated Killer cell を誘導する方法。

i) (a) または (b) または (c) の方法により抗CD4抗体を共有結合した不溶性担体または、CD8抗体を共有結合した不溶性担体を用いて、末梢血リンパ球からCD4⁺細胞を分画した後、分画したCD4⁺細胞をinterleukin-2と共に、*in vitro* により培養し、Lymphokine Activated Killer cell を誘導する方法。

(j) (a) または (b) または (c) の方法により抗CD34抗体を共有結合した不溶性担体、および抗CD

38抗体を共有結合した不溶性担体および、抗HLA-A抗体を共有結合した不溶性担体および、抗HLA-B抗体を共有結合した不溶性担体および、抗HLA-C抗体を共有結合した不溶性担体および、抗HLA-DR抗体を共有結合した不溶性担体および、抗HLA-DP抗体を共有結合した不溶性担体および、抗HLA-DQ抗体を共有結合した不溶性担体および、single cell depositing unitとを用いて造血幹細胞を分画する方法。

(k) (a) または (b) または (c) の方法により抗CD34抗体を共有結合した不溶性担体、および抗CD38抗体を共有結合した不溶性担体および、血しょう分離器を用いて、造血幹細胞を分画する方法。

(l) (j) または (k) の方法により分画した造血幹細胞をサイトカインと共にin vitro法により増殖する方法。

(m) 不溶性担体が、ポリビニルアルコール、およびセルロース、およびポリアクリルアミド、およびポリアクリル酸、およびメタクリル酸、およびポリメチルメタクリレート、およびポリイソプロピルアクリルアミド、およびポリエステル、およびポリアミド、およびポリエチレン、およびポリプロピレン、およびポリスチレンの中から選択されたことを特徴とする(c)の不溶性担体および実験器具。

(n) 10~90%のバルブを含有し、その繊維径が3~50 μ mで、繊維密度が0.3~1.5g/cm³であることを特徴とする繊維製品。

(o) 10~90%のバルブを含有し、その繊維径が3~50 μ mで、繊維密度が0.3~1.5g/cm³であることを特徴とする繊維製品を充填したカラム。

(p) 10~90%のバルブを含有し、その繊維径が3~50 μ mで、繊維密度が0.3~1.5g/cm³であることを特徴とする繊維製品を用いた造血幹細胞的分画方法。

(q) (a) または (b) または (c) 記載の方法により調製した不溶性担体および(n)記載の繊維製品を用いて、細胞および末梢血リンパ球を分画する方法。よりなる。本発明に関わる共有結合方法により、白血球分化抗原に対するモノクローナル抗体の活性を失うことなく、白血球分化抗原に対するモノクローナル抗体を容易に、堅固に共有結合することが可能になる。また、本発明に関わる共有結合方法により、白血球分化抗原に対するモノクローナル抗体を共有結合した実験器具から、白血球分化抗原に対するモノクローナル抗体を剥離させることなく、幹細胞を分画することや、リンパ球を活性化することが可能である。

【0008】本発明では、最初に担体表面にアジド基を有するポリマーや、低分子化合物を塗布する。使用するポリマーとしては、アジド基を導入したスチレン、アジド基を含有するメタクリレート類等のビニルモノマー単

独重合体、アジド基含有モノマーとスチレン、アクリルアミド等のアジド基を含有しないビニルモノマーとの共重合体が考えられるが、安定性を考慮すると、スチレン、メチルメタクリレート、ジメチルアクリルアミドとの共重合体が特に好ましい。これらの共重合体におけるアジド基の割合は、モル比で10~20%存在することが好ましい。前記ポリマーの分子量は、数平均分子量で100,000以上であることが好ましい。また、アジド基を有する低分子化合物としては、ビスアジド化合物や、イオン性基等が考えられるが、必ずしもこれらに限定されるものではない。これらのアジド基を有する低分子化合物では、白血球分化抗原に対するモノクローナル抗体を安定に固定化させる為に、アジド基を2個以上含有することが望まれる。白血球分化抗原に対するモノクローナル抗体を固定化する方法としては、プラスチック、ガラス、セラミック、繊維、紙、合成紙、中空糸、金属等が考えられるが、これらに限定される訳ではなく、また、それらの形状、表面の状態等には、何等制限はない。

【0009】アジド基を有する化合物は、ポリマーでも、低分子化合物であっても、揮発性有機溶媒に溶解し、被固定化表面に塗布、乾燥することにより実施することが可能である。塗布により、形成される皮膜の厚さは、ポリマーの場合は、0.1~3.0 μ mであることが好ましい。低分子の場合は、分子層が複数になる様に塗布することが好ましい。本発明によって固定化される白血球分化抗原に対するモノクローナル抗体は、分画しようとする細胞および末梢血リンパ球によって、自由に選択することが可能である。これらの白血球分化抗原に対するモノクローナル抗体を被固定化担体に存在させる方法には、白血球分化抗原に対するモノクローナル抗体の溶液に被固定化担体を浸漬し、白血球分化抗原に対するモノクローナル抗体を被固定化担体に吸着させる方法が考えられる。

【0010】次に、白血球分化抗原に対するモノクローナル抗体の存在する被固定化担体に紫外線を照射することにより、短時間で固定化が完了する。使用される光源としては、水銀灯等が考えられる。白血球分化抗原に対するモノクローナル抗体の水溶液または、コロイド溶液または、懸濁液に被固定化担体を浸漬し、白血球分化抗原に対するモノクローナル抗体を被固定化担体に吸着させた後に紫外線を照射する場合には、必ずしも溶液を乾燥させる必要はない。紫外線照射に特に限定される条件はないが、被固定化白血球分化抗原に対するモノクローナル抗体を防御する為には、320nmよりも長波長の光を照射することが好ましい。紫外線を照射した後、固定化されなかった白血球分化抗原に対するモノクローナル抗体は洗浄により除去する。洗浄に使用される溶媒にも特に制限はない。

【0011】以上の操作からなる本発明によれば、白血

球分化抗原に対するモノクローナル抗体と塗布したポリマー間との共有結合、更に、塗布したポリマー間とポリマー内との架橋が生成する為、被固定化担体が安定して存在し続ける。被固定化担体がプラスチックの場合には、被固定化担体の表面と塗布した白血球分化抗原に対するモノクローナル抗体との間に共有結合が生成する為、被固定化担体が更に安定して存在し続ける。アジド基を有する化合物が低分子化合物である場合にも、化学療法剤と塗布した低分子化合物間との共有結合、更に、塗布した低分子化合物間の架橋が生成する為、被固定化担体が安定して存在し続ける。

【0012】

【実施例】本発明を実施例により更に詳細に説明する。本発明は実施例により、何ら限定されるものではない。

《実施例1.》

1) アジドスチレンの合成

エタノール-濃塩酸混液20mlに、3-ニトロスチレン5gを懸濁させ、更に、エタノールに溶解したSnCl₄・2H₂O溶液を激しく攪拌しながら添加し、室温で一晩、反応させた。NaOHにより中和し、固体成分を濾別し、濾液より生成物をエーテル抽出した。エーテル層をMgSO₄で乾燥した後、濃硫酸を加え、中間体を得た。同中間体を10%硫酸溶液10mlに溶解し、氷冷し1NのNaNO₂水溶液を添加した。2時間後に、NaN₃水溶液を添加し、室温に戻した後、3時間攪拌した。酢酸エチルにより抽出し、抽出液を0.1N NaHCO₃水溶液と精製水で洗浄し、MgSO₄を添加し、乾燥した。溶媒を留去し、クロロホルム/ヘキサン(1/4)混合溶媒に溶解し、シリカゲルカラムで精製した。溶媒を留去し、3-アジドスチレンを得た。

11) アジドスチレン-スチレン共重合体の合成

アジドスチレン1モルとスチレン4モルとをベンゼンで5倍に希釈し、0.01当量のN, N'-アゾビスイソブチロニトリル(AIBN)を添加、脱気、封管し、60℃で4時間重合した。放冷後、メタノール中に注ぎ、沈殿したアジドスチレン-スチレン共重合体を回収した。得られた共重合体の数平均分子量は、10万であった。

111) 抗CD34抗体固定化PETフィルムの調製
前記方法により合成したアジドスチレン-スチレン共重合体をアセトンに溶解し、1%溶液を調製した。この溶液100mlを1m²のポリエチレンテレフタレート(PET)フィルムの両面に塗布、乾燥し、アジドスチレン-スチレン共重合体の皮膜を形成した。リン酸緩衝液に0.01%の割合で溶解した抗CD34抗体溶液に、前記処理をしたPETフィルムを1時間浸漬し、抗CD34抗体を吸着させ、高圧水銀灯を用いて、紫外線を1分間照射した。次に、当該PETフィルムを精製水で水洗、乾燥した。

【0013】《実施例2.》抗CD34抗体固定化PETフィルム充填カラムを用いた増血幹細胞の吸着実施例
1. で調製した抗CD34抗体固定化PETフィルムを1cm²四方に切断した後、1N NaOHで洗浄し、更に、パイロジェンフリーの精製水で十分に洗浄、乾燥し、パイロジェンフリーのカラムに充填した。次に、パイロジェンフリーの10%PBSを含むRPMI 1640培地で安定化させた。次に、G-CSFを5日間投与後に採血した末梢血液1,000mlからFicoll Paque (Pharmacia社製)を用いて分離し、10%PBSを含むRPMI 1640培地に浮遊したリンパ球画分10mlを前記カラムにapplyし、流速1ml/minで流下させた。流出液を1mlづつ分画した。各画分についてコールター社製フローサイトメトリーを用いて、抗CD34抗体と反応する細胞の検出を行なった。その結果、各画分から抗CD34抗体と反応する細胞は検出されず、CD4およびCD8抗体と反応する細胞が検出された。従って、末梢血液中の増血幹細胞はすべて、抗CD34抗体固定化PETフィルム充填カラムに吸着された。また、白血球画分は抗CD34抗体固定化PETフィルム充填カラムには全く吸着されなかった。

【0014】《実施例3.》

1) アジドベンゾイルオキシエチルメタクリレート-メチルメタクリレート共重合体の合成

N, N-ジメチルホルムアミド(DMF)100mlにp-アジド安息香酸10gを溶解、氷冷し、トリエチルアミン8.5mlを添加し、更に、クロロ燐酸イソブチル8.3mlを添加した。次に、DMF300mlにヒドロキシエチルメタクリレート5.2mlを溶解し、前記溶液に添加し、60℃で5時間攪拌した。溶媒を留去し、酢酸エチルを添加、抽出し、10%クエン酸水溶液、精製水、4%NaHCO₃水溶液で順次洗浄し、無水Na₂SO₄を添加、乾燥した。溶媒を留去した後、クロロホルムに溶解し、シリカゲルカラムで精製した。溶媒を留去し、アジドベンゾイルオキシエチルメタクリレートを得た。

11) アジドベンゾイルオキシエチルメタクリレート-メチルメタクリレート共重合体の合成

前記方法により合成したアジドベンゾイルオキシエチルメタクリレート1molとメチルメタクリレート4molとをDMFで2倍に希釈し、0.01等量のAIBNを添加、脱気、封管し、60℃で3時間重合した。冷却後、大量のエチルエーテルに注ぎ、沈殿したアジドベンゾイルオキシエチルメタクリレート-メチルメタクリレート共重合体を得た。得られた共重合体の数平均分子量は15万であった。

111) 抗CD4抗体固定化フラスコの調製

前記方法により合成したアジドベンゾイルオキシエチルメタクリレート-メチルメタクリレート共重合体をアセ

トンに溶解し、1%溶液を調製した。この溶液各30 μ lをポリアクリルアミド製フラスコの内面に塗布、乾燥し、アジドベンゾイルオキシエチルメタクリレート-メチルメタクリレート共重合体の皮膜を形成した。前記処理をしたポリアクリルアミド製フラスコの内面に、リン酸緩衝液に0.01%の割合で溶解した抗CD4抗体溶液200 μ lを添加し、CD4抗体溶液を吸着させ、電子線加速器(加速電圧2MeV、電子線電流1mA)を用いて、電子線を30秒間照射した。次に、当該ポリアクリルアミド製フラスコを精製水で水洗、乾燥した。

【0015】《実施例4.》

lymphokine-activated killer cellの誘導

末梢血から沈殿法に従い、末梢血リンパ球を分離した。次に、実施例3.で調製した抗CD4抗体固定化フラスコを用いて、CD4⁺末梢血リンパ球を分離し、IL-2、自己血しょう、後期pokeweed mitogenと共に2週間培養した。2週間後に前記操作により得られた細胞(1 \times 10⁴ cell/well)と、ラジオアイソトープ(⁵¹Cr-クロム酸ナトリウム)標識した、ヒト子宮頸部癌由来Hela細胞(Hela-S3:1 \times 10² cell/well)と、pokeweed mitogen(1 μ g/ml)とをmicrotest plate wellに取り、炭酸ガス培養器で8時間培養した。キラー活性の検量は、リンパ球浮遊液の代りにRPMI 1640培地を添加したものを0%、リンパ球浮遊液の代りに2%SDSを添加したものを100%とした。キラー活性の検量の結果、8時間後にmicrotest plate well内のHela細胞は消滅し、lymphokine-activated killer cellの誘導が確認された。

【0016】《実施例5.》

抗CD4抗体固定化不織布の調製

ラジカル重合により、2-(4-アジドベンゾイルオキシ)エチルメタクリレート:スチレン:o-ニロベンジルアクリレートの三元共重合体(仕込モル比3:6:1)(以下PASN)を合成した。デュボン社製不織布(Sontara 8005)に、前記PASNを塗布、薄膜を形成した後、紫外線を照射した。次に当該不織布に0.01%の抗CD4抗体と水溶性カルボジミドを含有するリン酸緩衝液に浸漬し、37℃で16時間反応させた。次に当該不織布を1MのNaCl水溶液およびリン酸緩衝液で、洗浄乾燥した。

【0017】《実施例6.》

末梢血リンパ球の分離

実施例5で調製した抗CD4抗体固定化不織布10gをカラムに充填した。次に、当該カラム3%のストレプトマイシンを含有するリン酸緩衝液で十分に洗浄した後、バイロジェンフリーの精製水で十分に洗浄し、無菌的に

乾燥した。続いて、当該カラムをガンマ線滅菌した。多発性硬化症患者から採血した血液から血しょう分離器を用いて、血しょうを分離した。当該血しょう50mlを上記カラムにアブライし、1ml/minの流速で流出させた。カラム流出血しょうをプールし、コールター社製フローサイトメトリーにより分析した。その結果、カラム流出血しょうからは、CD4⁺細胞(リンパ球)は検出されなかった。

【0018】《実施例7.》

10 抗CD34抗体固定化不織布の調製

デュボン社製不織布(Sontara 8005)に、ポリイソプロピルアクリルアミドを塗布、薄膜を形成した後電子線を照射し、ポリイソプロピルアクリルアミドをグラフト重合した。当該不織布に、PASNを塗布、薄膜を形成した後、紫外線を照射した。次に当該不織布に1%の抗CD34抗体と水溶性カルボジミドを含有するリン酸緩衝液に浸漬し、37℃で16時間反応させた。次に当該不織布を1MのNaCl水溶液およびリン酸緩衝液で、洗浄乾燥した。

20 【0019】《実施例8.》

抗CD34⁺細胞の分離

実施例7で調製した抗CD34抗体固定化不織布10gをカラムに充填した。次に、当該カラムを3%のストレプトマイシンを含有するリン酸緩衝液で十分に洗浄した後、バイロジェンフリーの精製水で十分に洗浄し、無菌的に乾燥した。続いて、当該カラムをガンマ線滅菌した。G-CSFを3日間投与した健康人から採血した血液から血しょう分離器を用いて、血しょうを分離した。当該血しょう50mlを前記カラムにアブライし、1ml/minの流速で流出させた。当該カラムを100mlのリン酸緩衝液で十分に洗浄した後、当該カラムを37℃で30分インキュベートした後、当該カラムを37℃に加温したリン酸緩衝液100mlで洗浄し、CD34⁺細胞を回収した。カラム流出血しょうをプールし、コールター社製フローサイトメトリーにより分析した。その結果、カラム流出血しょうからは、CD34⁺細胞は検出されなかった。上記健康人から採血し、カラム処理を行わない血しょうについて、同様にフローサイトメトリー分析を行なった。その結果、CD34⁺細胞が

40 【0020】《実施例9.》

CD34⁺細胞の分離

規定量のG-CSFを5日間投与後に採血した末梢血液1,000mlからFicoll Paque(Pharmacia社製)を用いて分画し、10%PBSを含むRPMI 1640培地に浮遊したリンパ球画分10mlをデュボン社製不織布(Sontara 8005:未処理)充填カラムにアブライし、1ml/minの流速で流出させた。次に、当該カラムを100mlのリン酸緩衝液で十分に洗浄し、白血球を流出させた後、

非流出画分を物理的に溶出させ、プールした。プールした画分をコールター社製フローサイトメトリーにより分析した。その結果、プールした画分からは、アブライ画分の95%のCD34⁺細胞と5%の白血球画分が検出された。

【0021】《実施例10.》

CD34細胞の定量

実施例3の方法に準じて96穴マイクロタイタープレートを用意した。当該マイクロタイタープレートに骨髓液からFicoll Paqueにより調製したリンパ球画分100 μ lを分取し、室温で30分インキュベートした。次に当該マイクロタイタープレートの各穴をリン酸緩衝液200 μ lで3回洗浄した。次に当該マイクロタイタープレートの各穴に酵素標識抗CD34抗体200 μ lを分取し、室温で30分インキュベートした。次に当該マイクロタイタープレートの各穴をリン酸緩衝液200 μ lで3回洗浄した。次に当該マイクロタイタープレートの各穴に酵素基質液200 μ lを分取し、室温で30分インキュベートした。30分後に、当該マイクロタイタープレートの各穴に反応停止液200 μ lを分取し反応を停止した。標準CD34細胞を用いて同様の操作を行ない、描いた検量線から、CD34細胞の量を求めた。

【0022】《実施例11.》

抗CD34抗体固定化PETフィルム充填カラムを用いた増血幹細胞の吸着

実施例1.で調製した抗CD34抗体固定化PETフィルムを1cm²四方に切断した後、1N NaOHで洗浄し、更に、パイロジェンフリーの精製水で十分に洗浄、乾燥し、パイロジェンフリーのカラムに充填した。次に、パイロジェンフリーの10%PBSを含むRPMI 1640培地で安定化させた。次に、規定量のG-CSFを5日間投与した健康人末梢血液1,000mlからFicoll Paque (Pharmacia社製)を用いて分画し、10%PBSを含むRPMI 1640培地に浮遊したリンパ球画分10mlにラジオアイソトープ(⁵¹Cr-クロム酸ナトリウム)標識したヒト子宮頸部癌由来HeLa細胞(HeLa-S3:1x10⁴ cells)を混合した後、前記カラムにapplyし、流速1ml/minで流下させ、流出液を1mlづつ分画した。各画分についてコールター社製フローサイトメトリーを用いて、抗CD34抗体と反応する細胞の検出を行なった。その結果、各画分から抗CD34抗体と反応する細胞およびラジオアイソトープ標識したヒト子宮頸部癌由来HeLa細胞は検出されず、CD4およびCD8抗体と反応する細胞が検出された。従って、末梢血液中の増血幹細胞はすべて、抗CD34抗体固定化PETフィルム充填カラムに吸着された。また、白血球画分およびラジオアイソトープ標識したヒト子宮頸部癌由来HeLa細胞は抗CD34抗体固定化PETフィルム充填カラムには全く吸着されなかった。

フロントページの続き

(54)【発明の名称】 光化学反応による、白血球分化抗原に対するモノクローナル抗体の担体への共有結合方法と、その担体を用いた細胞の分画定量方法、およびLymphokine Activated Killer cellの誘導方法。

THIS PAGE BLANK (USPTO)